



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 63 006.5

**Anmeldetag:** 16. Dezember 2000

**Anmelder/Inhaber:** Aventis Pharma Deutschland GmbH,  
Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Verwendung von Enoxaparin zur Behandlung  
von Osteoarthritis

**IPC:** A 61 K 31/727

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 30. August 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

Brand

## 5 Verwendung von Enoxaparin zur Behandlung von Osteoarthrose

Enoxaparin ist bekannt und wird zur Behandlung von Thrombosen eingesetzt (US 5,389,618). Enoxaparin-Na ist das Natrium-Salz von niedermolekularem Heparin, das durch alkalische Depolimerisation des Benzylesterderivates von Heparin aus Schweine-Intestinal-Mucosa gewonnen wird. Die Hauptmenge der Komponenten trägt eine 4-enopyranose-Uronat-Struktur am Nicht-reduzierenden-Ende ihrer Kette.

Die durchschnittliche Molekülmasse beträgt etwa 4500 Dalton.

Der prozentuale Anteil von Molekülen kleiner 2000 Dalton liegt zwischen 12% und 20%.

Die Massenprozent-Anteil der Ketten einer Größe zwischen 2000 und 8000 Dalton liegt zwischen 68% und 88% in Bezug auf den European Pharmacopoeia calibration reference Standard für niedermolekulare Heparine. Der Sulfatierungsgrad liegt bei 2 pro Disaccharid-Einheit. Die Enoxaparin-Polysaccharid-Kette ist wie bei Heparin aus alternierenden Einheiten von sulfatierten Glucosaminen und Uron-Säuren, die durch glycosidische Bindungen verknüpft sind, zusammengesetzt. Die Struktur unterscheidet sich von Heparin beispielsweise dadurch, dass durch den Depolymerisierungsprozess eine Doppelbindung am Nicht-reduzierenden-Ende der Kette entsteht.

Enoxaparin kann von Heparin unterschieden werden durch, UV-Spektroskopie und durch das  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance Spektrum, welche die Doppelbindung im terminalen Ring zeigen, und durch high performance size exclusion chromatography.

Im Krankheitsbild der Osteoarthrose stellt die Degradation des Aggrecans, das Hauptproteoglykan des artikulären Knorpels, ein sehr frühes und entscheidendes Ereignis dar. Der pathologische Verlust des Aggrecans, der das Hauptproteoglykan des Knorpels darstellt, beinhaltet proteolytische Spaltungen in seiner interglobulären Domäne. Aminosäuresequenzanalysen von Proteoglykanmetaboliten, isoliert aus der Synovialflüssigkeit von Patienten, die an einer Gelenkschädigung, an Osteoarthrose oder an einer entzündlichen Gelenkerkrankung leiden, zeigten, daß eine proteolytische Spaltung bevorzugt zwischen den Aminosäuren Glu<sup>373</sup> und Ala<sup>374</sup> in der interglobulären Domäne des humanen Aggrecans stattfindet (Lohmander et al. Arthritis Rheum. 36, (1993), 1214-1222). Die proteolytische Aktivität, die für diese Spaltung verantwortlich ist,

wird als „Aggrecanase“ bezeichnet und kann zur Superfamilie der Metalloproteinasen (MP) bzw. Matrix-Metalloproteinasen gerechnet werden.

- Bei den Metalloproteinasen ist Zink im katalytisch aktiven Zentrum essentiell. MMP
- 5 spalten Kollagen, Laminin, Proteoglykane, Elastin oder Gelatin unter physiologischen Bedingungen und spielen daher eine wichtige Rolle im Knochen und Bindegewebe. Eine Vielzahl von verschiedenen Inhibitoren der MMPs sind bekannt (EP 0 606 046; WO94/28889).
- 10 Nachteil der bekannten Inhibitoren der MMPs ist häufig die mangelnde Spezifität der Hemmung für nur eine Klasse der MMPs. Daher hemmen die meisten MMP-Inhibitoren mehrere MMPs gleichzeitig.
- 15 In dem Bestreben, wirksame Verbindungen zur Behandlung von Bindegewebs-erkrankungen zu finden, wurde nun gefunden, dass das erfindungsgemäß eingesetzte Enoxaparin ein starker Inhibitor der Matrix-Metalloproteinasen neutrophilen Kollagenase (MMP-8), Aggrecanase, hADAMTS1 und Gelatinase A (MMP-2) ist, während das Enoxaparin im wesentlichen unwirksam bei den MMPs 1, 3, 13 und 14 ist.
- 20 Die Erfindung betrifft daher die Verwendung von Enoxaparin zur Herstellung von Arzneimitteln zur Prophylaxe und Therapie von Erkrankungen, an deren Verlauf eine verstärkte Aktivität mindestens einer der Matrix-Metalloproteinasen neutrophilen Kollagenase (MMP-8), Aggrecanase, hADAMTS1 und Gelatinase A (MMP-2) beteiligt ist.
- 25 Enoxaparin und physiologisch verträgliche Salze von Enoxaparin sind bekannt und lassen sich beispielsweise wie in US 5,389,618 beschrieben herstellen.
- Aufgrund der pharmakologischen Eigenschaften eignet sich Enoxaparin zur Prophylaxe
- 30 und Therapie all solcher Erkrankungen, an deren Verlauf eine verstärkte Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen MMP 8, Aggrecanase, hADAMTS1 und MMP 2 beteiligt sind. Dazu gehören degenerative Gelenkerkrankungen wie Osteoarthrosen, Spondylosen, Knorpelschwund nach Gelenktrauma oder längerer Gelenksruhigstellung nach Meniskus- oder Patellaverletzungen oder Bänderrissen. Ferner gehören dazu auch
- 35 Erkrankungen des Bindegewebes wie Kollagenosen, Periodontalerkrankungen, Wundheilungsstörungen und chronische Erkrankungen des Bewegungsapparates wie

entzündliche, immunologisch oder stoffwechselbedingte akute und chronische Arthritiden, Arthropathien, Myalgien und Störungen des Knochenstoffwechsels.

Die erfindungsgemäße Verwendung von Enoxaparin erfolgt im allgemeinen parenteral.

- 5 Die Applikation von Enoxaparin kann durch subkutane, intraartikuläre, intraperitoneale oder intravenöse Injektion erfolgen. Bevorzugt ist die intraartikuläre Injektion. Die rektale, orale, inhalative oder transdermale Applikation ist auch möglich.

- 10 Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels, das dadurch gekennzeichnet, daß man Enoxaparin mit einem pharmazeutisch geeigneten und physiologisch verträglichen Träger und gegebenenfalls weiteren geeigneten Wirk-, Zusatz- oder Hilfsstoffen in eine geeignete Darreichungsform bringt.

- 15 Vorzugsweise werden die pharmazeutischen Präparate in Dosierungseinheiten hergestellt und verabreicht, wobei jede Einheit als aktiven Bestandteil eine bestimmte Dosis von Enoxaparin enthält. Bei Injektionslösungen in Ampullenform kann diese Dosis von etwa 5 µg bis zu etwa 200 mg, vorzugsweise aber von etwa 10 mg bis 40 mg, betragen.

- 20 Für die Behandlung eines erwachsenen, etwa 70 kg schweren Patienten sind je nach Wirksamkeit der Verbindung gemäß Formel I, Tagesdosen von etwa 10 mg bis 500 mg Wirkstoff, bevorzugt etwa 20 mg bis 100 mg indiziert. Unter Umständen können jedoch auch höhere oder niedrigere Tagesdosen angebracht sein. Die Verabreichung der Tagesdosis kann sowohl durch Einmalgabe in Form einer einzelnen Dosierungseinheit  
25 oder aber mehrerer kleinerer Dosierungseinheiten als auch durch Mehrfachgabe unterteilter Dosen in bestimmten Intervallen erfolgen.

- Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von ADAMTS1 zur Herstellung eines Testkits zur Bestimmung eines Inhibitors für die Aggrecanase, der dadurch  
30 gekennzeichnet ist, dass man ADAMTS1, ein Substrat und einen Inhibitor inkubiert und die durch die Aggrecanase-Aktivität generierten Neoepitope bestimmt.

## Beispiel 1

### Wirkung von Enoxaparin auf die Aggreacanase von Schweinechondrozyten

- Zur Generierung der Aggreacanase-Aktivität wurden Schweinechondrozyten für 4 Tage mit 10ng/ml mit IL-1a stimuliert (Hughes, C.E., Little, C.B., Buettner, F.H., Bartnik, E., Caterson, B., (1998) Differential expression of Aggreacanase and Matrix metalloproteinase activity in chondrocytes isolated from bovine and porcine articular cartilage. J. Biol. Chem. 273, 30576-30582). In einer 96-well-Zellkulturplatte wurden 200 µl des Aggreacanase-Aktivität haltigen Chondrocytenüberstandes mit 100µl (Zellkulturmedium / Puffer) DMEM pro well gemischt. Als Inhibitor wurden 5 µl Enoxaparin, das in entsprechender Konzentration in H<sub>2</sub>O gelöst wurde, eine Stunde vor Substratzugabe (5 µg rAgg1mut (Büttner et al.; Biochem. J. (1998), 333, 159-165)) zugegeben. Der Ansatz wurde für 17 h bei 37°C inkubiert und anschließend in eine ELISA-Platte überführt, um die durch Aggreacanase-Aktivität generierten Neoepitope mit dem Antikörper BC-3 (Hughes et al., Biochem. J. (1995), 305, 799-804) zu detektieren (Büttner et al., Trans. Orthop. Res. Soc. (1998), 23, 916).

Die Enzymaktivität wird durch ein repräsentatives Experiment in Tabelle 1 dargestellt als BC-3 Signal (Extinktion)

#### 20 Tabelle 1

Verdau von rAgg1mut durch Schweine-Chondrocyten-Aggreacanase:

Inhibition durch Enoxaparin

Enoxaparin (µg/ml)	mittleres BC-3 Signal n=2	Standardabweichung
0	1,15	0,031
0,0167	1,24	0,020
0,167	1,13	0,031
1,67	1,05	0,027
16,7	0,70	0,049
167	0,33	0,041
1670	0,44	0,027
16700	0,27	0,063
keine Aggreacanase und kein Enoxaparin	0,06	0,002
keine Aggreacanase und 16700 µg/ml Enoxaparin	0,07	0,019

Der  $IC_{50}$  lässt sich bei diesem Versuchsansatz bei etwa 80 µg/ml Enoxaparin bestimmen. Enoxaparin inhibiert die Aggrecanase-Aktivität von Schweinechondrozyten beim Verdau des Substrates rAgg1mut.

## 5 Beispiel 2

Wirkung von Enoxaparin auf die Aggrecanase von humanen dedifferenzierte Chondrozyten

- Zur Generierung der Aggrecanase-Aktivität wurden in einer 96-well-Zellkulturplatte 10 50000 humane dedifferenzierte Chondrozyten pro well für 47 h mit 0,01 ng/ml IL-1 $\alpha$  und 3 U TNF $\alpha$  in 200µl DMEM/F12 Medium (1:1) stimuliert. In einer 96-well-Zellkulturplatte wurden 200 µl des Aggrecanase-Aktivität haltigen Chondrocytenüberstandes mit 5 µl Enoxaparin (Clexane) als Inhibitor, das in entsprechender Konzentration in H<sub>2</sub>O gelöst wurde, eine Stunde vor Substratzugabe (2,5 µg rAgg1mut) vermischt. Der Ansatz wurde 15 für 4 h bei 37 °C inkubiert und anschließend in eine ELISA-Platte überführt, um die durch Aggrecanase-Aktivität generierten Neoepitope mit dem Antikörper BC-3 zu detektieren.

- Die Enzymaktivität wird durch ein repräsentatives Experiment in Tabelle 2 dargestellt als 20 BC-3 Signal (Extinktion).

Tabelle 2

Enoxparin µg/ml	Clexane 40 n=2	Clexane 20 n=2	Standard- abweichung (Clex 40)	Standard- abweichung (Clex 20)
0	1,20		0,043	
0,0167	1,13	1,05	0,091	0,017
0,167	1,0	0,97	0,025	0,044
1,67	0,99	0,92	0,064	0,009
16,7	0,95	0,87	0,037	0,048
167	0,72	0,72	0,043	0,002
1670	0,29	0,42	0,007	0,084
keine Aggrecanase und kein Enoxaparin	0,41		0,016	
Keine Aggrecanase und 1670 µg/ml Enoxaparin	0,19	0,22		

Der  $IC_{50}$  lässt sich bei diesem Testsystem bei etwa 200 µg/ml Enoxaparin bestimmen.

Enoxaparin inhibiert die Aggrecanase-Aktivität von humanen dedifferenzierte Chondrozyten beim Verdau des Substrates rAgg1mut.

5

### Beispiel 3

Wirkung von Enoxaparin auf die Aggrecanase-Aktivität von rekombinantem humanem ADAMTS1 Protein

- 10 Zur Generierung der Aggrecanase-Aktivität humaner ADAMTS1 wurden 293 Zellen mit einem ADAMTS1 Expressionsplasmid nach der Calcium-Phosphat Methode transfiziert. Das selbst konstruierte Expressionsplasmid trägt die kodierende Sequenz des humanen ADAMTS1 Gens, dem ein zusätzlich eingefügtes C-terminales FLAG-tag folgt. Das Gen steht unter der Expressions-Kontrolle des CMV-Promotors.
- 15 Die Überstände der Transfektion werden über eine M2 Antikörper Agarose Säule gegeben und das über den FLAG-tag an den M2-Antikörper gebundene hADAMTS1 mit FLAG-Peptid eluiert. Das so angereinigte humane ADAMTS1 wird im Aggrecanase-Assay eingesetzt.
- 20 In einer 96-well-Zellkulturplatte wurden 10 µl Eluat mit rekombinantem humanem ADAMTS1 und 300µl DMEM mit 5 µl Enoxaparin (Clexane) als Inhibitor, das in entsprechender Konzentration in H<sub>2</sub>O gelöst wurde, eine Stunde vor Substratzugabe (1 µg rAgg1mut) vermischt. Der Ansatz wurde für 4 h bei 37°C inkubiert und anschließend in eine ELISA-Platte überführt, um die durch Aggecanase-Aktivität generierten Neoepitope mit dem Antikörper BC-3 (Hughes et al., Biochem. J. 305,0799-804,01995) zu detektieren (Buettner et al., Trans. Orthop. Res. Soc. 23, 916, 1998).
- 25

Die Enzymaktivität eines repräsentativen Experiments wird in Tabelle 3 dargestellt als BC-3 Signal (Extinktion)

Tabelle 3

Enoxaparin µg/ml	mittleres BC-3 Signal n=2
0	1,36
0,0167	1,35
0,167	1,34
1,67	1,32
16,7	0,87
167	0,27
1670	0,23
kein hADAMTS1/ kein Enoxaparin	0,11

Der IC<sub>50</sub> lässt sich bei diesem Assay bei etwa 25 µg/ml Enoxaparin bestimmen.

- 5 Enoxaparin inhibiert die Aggrekanase-Aktivität von rekombinatem humanen ADAMTS1 beim Verdau des Substrates rAgg1mut.

#### Beispiel 4

- 10 Keine Wirkung von Enoxaparin auf die katalytische Domäne von MMP-3 beim Verdau des rekombinanten Substrates rAgg1mut

- 15 In einer 96-well-Zellkulturplatte wurden 31,3 µl/µl rekombinante humane MMP-3 (katalytische Domäne: G98-P273 präpariert nach der Methode von Ye et al., Biochemistry, 31, 11231-11235, 1992) in MMP-3 Verdaupuffer (0,1 M MES; 0,1 M NaCl; 0,01 M CaCl<sub>2</sub>; 0,5% Brij; pH 6,0) mit 5 µl Enoxaparin (Clexane) als Inhibitor, das in entsprechender Konzentration in H<sub>2</sub>O gelöst wurde, eine Stunde vor Substratzugabe (5 µg rAgg1mut) vermischt. Der Ansatz wurde für 8 h bei 37°C inkubiert und anschließend in eine ELISA-Platte überführt, um die durch MMP-3-Aktivität generierten Neoepitope (Spaltung an den Aminosäuren N341-F342) mit dem Antikörper BC-14 (Hughes et al., Biochem. J. (1995), 305, 799-804) zu detektieren (Buettner et al., Trans. Orthop. Res. Soc. 23, 916, 1998).
- 20

Die Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.



Tabelle 4

Enoxaparin µg/ml	mittleres BC-14 Signal n=2	Standard- abweichung
0	0,97	0,044
0,0167	1,02	0,004
1,67	1,03	0,075
167	0,96	0,019
16700	0,94	0,042
kein MMP-3 und kein Enoxaparin	0,14	0,057
kein MMP-3 und 16700 µg/ml Enoxaparin	0,12	0,050

Enoxaparin zeigte keine Wirkung auf die katalytische Domäne von MMP-3 beim Verdau des rekombinanten Substrates rAgg1mut.

5

#### Beispiel 5

10 Darstellung und Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Gelatinase A (MMP-2) und der Neutrophilen-Kollagenase (MMP-8).

15 Die beiden Enzyme Gelatinase A (MMP-2) und Neutrophile-Kollagenase (MMP-8) wurden von Roche bzw Biocon bezogen. Zur Messung der Enzymaktivität oder der Enzyminhibitorwirkung werden 10 µl Enzym-haltige Pufferlösung mit 10 µl H<sub>2</sub>O das gegebenenfalls den Enzyminhibitor enthält, für 15 Minuten inkubiert. MMP-2 (20 mUnit) oder MMP-8 (20ng) werden nach der von Knight beschriebenen Methode (Knight et al. (1992) FEBS letters 296,263) mit 10 µl einer 10%igen (v/v) wäßrigen Dimethylsulfoxid-Lösung, die 0,1 mmol/l des fluorogenen Substrates (7-Methoxycoumarin-4-yl)acetyl-Pro-Leu-Gly-Leu-3-(2',4'-dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl-Ala-Arg-NH<sub>2</sub> (Bachem, 20 Heidelberg, Deutschland) inkubiert und die Enzymreaktion fluoreszenzspektroskopisch verfolgt (328 nm (ex) / 393 nm(em)). Die Fluoreszenzmessung erfolgt für 15 Minuten. Die initiale Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion wird ohne Inhibitorzugabe ermittelt und als 100% Aktivität definiert.

25 Die eingesetzten Verbindungen waren unfractioniertes (UF) Heparin mit einem Molekulargewicht von etwa 15000 Dalton und einer 3000 Dalton (LMW) Heparin-

Fraktion (beide erhältlich bei Sigma) und Enoxaparin. Getestet wurden die MMP-Aktivitäten von MMP-2 und MMP-8.

- Die in Tabelle 5 aufgeführten Inhibitionen wurden bei einer Konzentration von jeweils 5  $\mu\text{g/ml}$  der eingesetzten Verbindungen ermittelt und mit einer Kontrolle ohne Inhibitor (100%) verglichen.

Tabelle 5

Verbindung	MMP-2 Inhibition (%)	MMP-8 Inhibition (%)
UF-Heparin	41	1
LMW-Heparin	27	8
Enoxaparin	70	28

## Patentansprüche:

1. Verwendung von Enoxaparin zur Herstellung von Arzneimitteln zur Prophylaxe und Therapie von Erkrankungen, an deren Verlauf eine verstärkte Aktivität mindestens einer der Matrix-Metalloproteinasen neutrophilen Kollagenase, Aggrecanase, hADAMTS1 und Gelatinase A beteiligt ist.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkrankung eine degenerative Gelenkerkrankungen wie Osteoarthrosen, Spondylosen, Knorpelschwund nach Gelenktrauma oder längerer Gelenksruhigstellung nach Meniskus- oder Patellaverletzungen oder Bänderrissen ist oder eine Erkrankung des Bindegewebes wie Kollagenosen, Wundheilungsstörungen, Periodontalerkrankungen oder eine chronische Erkrankung des Bewegungsapparates wie entzündliche, immunologisch oder stoffwechselbedingte akute und chronische Arthritiden, Arthropathien, Myalgien oder eine Störungen des Knochenstoffwechsels ist.
3. Verwendung gemäß der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Applikation von Enoxaparin durch subkutane, intraartikuläre, intraperitoneale oder intravenöse Injektion, bevorzugt durch intraartikuläre Injektion, erfolgt.
4. Verwendung gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Dosis von Enoxaparin in der Injektionslösung von etwa 5 µg bis etwa 200 mg, vorzugsweise von etwa 10 mg bis 40 mg, beträgt.
5. Verwendung gemäß der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Applikation von Enoxaparin durch rektale, orale, inhalative oder transdermale Applikation erfolgt.
6. Verwendung von ADAMTS1 zur Herstellung eines Testkits zur Bestimmung eines Inhibitors für die Aggrecanase, dadurch gekennzeichnet, dass man ADAMTS1, ein Substrat und einen Inhibitor miteinander inkubiert und die durch die Aggrecanase-Aktivität generierten Neoepitope bestimmt.

## Verwendung von Enoxaparin zur Behandlung von Osteoarthrose

5

Enoxaparin ist geeignet zur Herstellung von Arzneimitteln zur Prophylaxe und Therapie von Erkrankungen, an deren Verlauf eine verstärkte Aktivität mindestens einer der Matrix-Metalloproteinasen neutrophilen Kollagenase, Aggrecanase, hADAMTS1 und Gelatinase A beteiligt ist.

10